บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

วัตถุดิบ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 วัตถุดิบ

- ข้าวกล้องหอมมะลิ ตราเบอร์ 5 ซื้อจากโลตัส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
- นมผงขาดมันเนยที่ผ่านการทำให้แห้งโดยกระบวนการ Spray drying ตรามิชชั่น (Mission , New Zealand)
- คาราจีแนน (carrageenan type K-100) (Copenhagen Pectin A/S, Denmark)
- น้ำตาลทรายขาว(มิตรผล) ซื้อจากโลตัส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
- เชื้อโยเกิร์ต (*Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* YC-380 : Chr. Hansen, Denmark)
- เชื้อโพรไบโอติค (*Bifidobacterium longum* Bb-46 : Chr. Hansen, Denmark)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต

- เตาแก๊สที่ใช้ในครัวเรือน
- ตะเกียงบุนเสน
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 35±1, 39±1 ,43±1 องศาเซลเซียส(Gallenkamp, England)
- หม้อนึ่งความดัน(Gallenkamp, England)
- เตาอบฆ่าเชื้อ
- บีกเกอร์สเตนเลสขนาด 2 ลิตร และ 1 ลิตร
- บีกเกอร์แก้ว(Pyrex, USA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ขวดแก้วฝาเกลียว(Schottt Duran, Germany)
- ปิเปตแบบ Measuring pipettes(HBG, Germany)
- อะลูมิเนียมฟอยล์(Diamond, USA)
- หม้ออะลูมิเนียม
- เครื่องปั่นผสม (National)

3.2.2 **อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ**

- เครื่องวัดสี ColorQuest II (Hunter Laboratory Inc., USA)
- เครื่องวัดความข้นหนืด Brookfiled Rotary Viscometer(USA)
- เครื่องวัด Instron Model 5565 (USA)

3.2.3 **อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี**

- Kjeldahl digestion set (Tecator, USA)
- pH meter (Hanna Instument, Italy)
- บิวเรต ขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร (HBG, Germany)
- ปิเปต ขนาด 1 , 5 และ 10 มิลลิลิตร (HBG, Germany)

3.2.4 **อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา**

- ปิเปตแบบ Measuring pipettes ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- จานเลี้ยงเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)
- เตาอบลมร้อน (Haereous, England)
- ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 100 , 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37±1 และ 43±1 องศาเซลเซียส (Gallenkamp, UK)
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี
- ตู้เย็น (Sharp, Thailand)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 สารเคมี

- น้ำกลั่น
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany)
- กรดซัลฟูริก (Merck, Germany)
- คอปเปอร์ซัลเฟต (Carlo erba, Italy)
- กรดเกลือ (Merck, Germany)
- เมธิลออเร้นจ์ (Fluka, Switzerland)
- ฟีนอล์ฟธาลีน (Merck, Germany)
- เมธิลีนบลู (Fluka, Switzerland)
- Petroleum ether (Carlo Erba, Italy)
- Diethyl ether (Carlo Erba, Italy)
- MRS Agar (Merck, Germany)
- Yeast extract glucose chloramphenical agar (Difco, USA)
- Yeast extract (Merck, Germany)
- Tryptone (Merck, Germany)
- Casamino acids (Difco, USA)
- Phytone peptone (BBL,USA)
- Potassium dihydrogen phosphate (M&B, USA)
- Fructose (Fluka, Switzerland)

3.4 เครื่องประมวลผลข้อมูล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 ศึกษาแนวทางในการพัฒนาสูตรเบื้องต้นของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น(Starter culture propagation)

(Tamime and Robinson, 1985)

เชื้อเริ่มต้นอยู่ในรูปของเชื้อเริ่มต้นแบบแห้งที่ถูกทำให้แห้งโดยวิธีการแช่เยือกแข็ง (Freeze dried) มีเชื้อประมาณ 1.0×10^{10} CFU/g ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์โยเกิร์ตในกลุ่มเทอร์โมฟิลิคแลคติค ได้แก่ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus.* ในอัตราส่วน 1:1 และเชื้อโพรไบโอติคชนิด *Bifidobacterium longum* มีเชื้อประมาณ 1.0×10^{8} CFU/g

1.1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นขั้นแรก (Stock Culture)

เตรียมสารละลายลิตมัส (Litmus solution) ซึ่งประกอบด้วยนมผงขาดมันเนย ร้อยละ 16 ลิตมัส ร้อยละ 2 ยีสต์แอกสแตรกท์ ร้อยละ 0.3 และแคลเซียมคาร์บอเนตให้พอตกตะกอนคลุมก้นหลอดพอดี 0.2 กรัม ตวงสารละลายลิตมัสลงในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 15X160 มิลลิเมตร ให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ต่อมานำมาทำให้สารละลายลิตมัสเย็นลงที่ 37 องศาเซลเซียส โดยแช่หลอดทดลองที่บรรจุสารละลายลิตมัสในน้ำที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อโพรไบโอติคและเชื้อโยเกิร์ตมาเพาะในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายลิตมัสที่ผ่านการฆ่าเชื้อดังกระบวนการข้างต้นและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำหลอดทดลองที่เพาะเชื้อโพรไบโอติคและเชื้อโยเกิร์ตเข้าเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยนำมาใช้ภายใน 2 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2 การทำ Mother culture

เตรียมนมที่ใช้เพาะเชื้อ *B. longum* และเชื้อโยเกิร์ตโดยใช้นมผงขาดมันเนย ร้อยละ 16 และยีสต์เอกสแตรกท์ ร้อยละ 0.1 จำนวน 100 มิลลิลิตร ในขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำให้นมที่เตรียมสำหรับใช้เพาะเชื้อ *B. longum* และเชื้อโยเกิร์ต ให้เย็นลงโดยแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อโยเกิร์ตและเชื้อ*B. longum* ที่เตรียมจากขั้นแรก (1.1.1) มาเพาะเลี้ยงในนมที่เตรียมได้จากข้างต้น โดยเติมเชื้อปริมาณร้อยละ 2 โดยปริมาตร(ในแต่ละขวด) นำเข้าบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นำมาใช้ภายใน 7 วัน

1.1.3 การทำ Intermediate starter

เตรียมนมที่ใช้เพาะเชื้อโพรไบโอติคและเชื้อโยเกิร์ตโดยใช้นมผงขาดมันเนย ร้อยละ 16 ปริมาณ 400 มิลลิลิตร ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำมาลดอุณหภูมิลงเหลือ 37 องศาเซลเซียส โดยแช่ขวดลงในน้ำที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อโพรไบโอติคและเชื้อโยเกิร์ตจาก Mother culture มาเพาะปริมาณ ร้อยละ 2 โดยปริมาตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนมีค่าความเป็นกรดด่าง(pH) 3.8-4.0 นำไปเก็บรักษาในตู้เย็นโดยนำมาใช้ในการทดลองภายใน 2 วัน เชื้อเริ่มต้นจาก Intermediate starter นี้จะใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องต่อไป และมีการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร HHD agar โดยวิธี spread plate บ่มในสภาพไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และย้อมสีแกรมดูลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ค-17)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การสำรวจเค้าโครงโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

ก่อนที่จะทำการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคขึ้นนั้น จำเป็นต้องมีการสร้างเค้าโครงผลิตภัณฑ์ เพื่อหาคุณลักษณะที่สำคัญตามความคิดของผู้ทดสอบชิม และต้องการให้พัฒนาผลิตภัณฑ์ไปในทิศทางใด ซึ่งวิธีการสร้างเค้าโครงผลิตภัณฑ์นั้นสามารถใช้หลักการของ Ideal ratio profile (Lawless and Hildegarde, 1998) ซึ่งทำได้โดยใช้ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตเติมเชื้อโพรไบโอติคต้นแบบเป็นตัวอย่างในการทดสอบ โดยใช้สูตรส่วนผสมโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 สูตรพื้นฐานโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละ)	
	คำนวณตามส่วนประกอบหลัก	คำนวณตามส่วนประกอบรวมทั้งหมด
หลัก		
น้ำ	80	70.05
ข้าวกล้อง	20	17.50
อื่นๆ		
นมผงขาดมันเนย	7	6.13
น้ำตาลทรายขาว	5	4.38
คาราจีแนน	0.2	0.18
หัวเชื้อโยเกิร์ต	1	0.88
หัวเชื้อโพรไบโอติค	1	0.88

1.2.1 กรรมวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

กรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติประกอบด้วยขั้นตอน 4 ขั้นตอน (ภาพที่ 2) ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.1 **การเตรียมวัตถุดิบ**

ชั่งน้ำหนักข้าวกล้องและชั่งตวงน้ำสะอาดในปริมาณสองเท่าของน้ำหนักของข้าวกล้องที่ใช้ทำการหุงโดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที เพื่อให้ได้ข้าวกล้องสุก จากนั้นนำข้าวกล้องสุกมาจำนวนปริมาณ ร้อยละ 20 และใช้น้ำสะอาดปริมาณ ร้อยละ 80 (w/w) ทำการปั่นผสมให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นผลไม้ (blender) ด้วยความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 3 นาที จะได้น้ำและเนื้อข้าวกล้องละเอียด ทำการชั่งน้ำหนักที่ได้เพื่อใช้ในการคำนวณส่วนผสมต่อไป

1.2.1.2 **การเตรียมส่วนผสม**

ทำการชั่งส่วนผสมตามสูตรพื้นฐานของโยเกิร์ตข้าวกล้องต้นแบบ โดยให้คิดน้ำหนักของน้ำข้าวกล้องที่ได้เป็นร้อยละ 100 ของน้ำหนักองค์ประกอบหลัก จากนั้นทำการหาปริมาณส่วนผสมอื่น ๆ คือ นมผงขาดมันเนย น้ำตาลทรายขาว และคาราจีแนน โดยคิดเป็นร้อยละของน้ำหนักองค์ประกอบหลัก ส่วนปริมาณเชื้อโยเกิร์ต (*L. bulgaricus* และ *S. themophilus*) และเชื้อ *B. longum* จะเติมลงไปในขั้นตอนสุดท้าย นำส่วนผสม คือ นมผงขาดมันเนยและน้ำตาลผสมให้เข้ากันก่อนเพื่อช่วยการละลายดีขึ้นเมื่อนำไปผสมกับน้ำข้าวกล้องเตรียมไว้ ส่วนคาราจีแนนนำไปละลายกับน้ำร้อนในปริมาณเล็กน้อยเพื่อช่วยให้คาราจีแนนละลายได้ดีขึ้น แล้วจึงนำมาผสมให้เข้ากันกับส่วนผสมอื่นในภายหลัง

1.2.1.3 **การฆ่าเชื้อด้วยความร้อน**

หลังจากชั่งตวงส่วนผสมที่ได้ในขั้นตอนที่ 1.2.1.2 แล้วทำการผสมส่วนผสมทั้งหมดคือ น้ำข้าวกล้อง นมผงขาดมันเนย น้ำตาลทรายขาวและคาราจีแนนให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นผสม จากนั้นทำการบรรจุส่วนผสมที่ได้ในขวดแก้วฝาแก้วฝาเกลียว ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝาให้สนิทและนำไปต้มในน้ำเดือด จนกระทั่งอุณหภูมิของส่วนผสมอยู่ที่ 85 องศาเซลเซียส ทำการลดระดับความร้อนคงให้อยู่ที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าวได้นำขวดแก้วฝาแกลียวที่บรรจุส่วนผสมที่ผ่านการให้ความร้อนดังกล่าวแช่ลงในอ่างน้ำเย็นที่ผสมน้ำแข็งทันทีเพื่อทำการลดอุณหภูมิให้เหลือประมาณ 37 องศาเซลเซียส ให้เร็วที่สุดเพื่อใช้สำหรับสำหรับการถ่ายเชื้อในขั้นตอนที่ 1.2.1.4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.1.4 การถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้น

เมื่อทำการฆ่าเชื้อส่วนผสมในขั้นตอนที่ 1.2.1.3 แล้ว แล้วลดอุณหภูมิส่วนผสมลงเหลือ 37 องศาเซลเซียส ได้ทำการถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากการเตรียม Intermediate culture ในข้อ 1.1.3 ไว้แล้วลงไป จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อตามอุณหภูมิและเวลาที่ได้กำหนดไว้ เมื่อครบเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก แล้วนำเข้าเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์ รวมถึงการประเมินทางประสาทสัมผัส ภายใน 2 วัน หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก

ข้าวกล้องสุกต่อน้ำอัตราส่วน 1:4

↓

ปั่นให้เข้ากัน

↓

เติมน้ำตาลทรายขาว+นมผงขาดมันเนย+สารให้ความคงตัว

↓

บรรจุในภาชนะปิดฝาสนิท

↓

ให้ความร้อนที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

↓

แช่ในน้ำเย็น ให้อุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 37 องศาเซลเซียส

↓

เติมหัวเชื้อ ผสม(*S. thermophilus*+ *L. bulgaricus*+ *B. longum*)

↓

หมักไว้ 16 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส

↓

โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

ภาพที่ 2 กรรมวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสำรวจเค้าโครงโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคทำได้โดยให้ผู้ทดสอบชิม 12 คน ระบุลักษณะสำคัญโดยการใช้สเกลเส้นตรงแบบ Horizontal line scale (ภาคผนวก ข-1) ให้ผู้ทดสอบชิมทำเครื่องหมายลงบนสเกลว่าลักษณะนั้นมีความรุนแรงหรือความเข้มข้นมากน้อยตามที่ผู้ทดสอบชิมรู้สึก โดยวิธี Ideal ratio profile scale (Lawless and Hildegarde, 1998) เมื่อได้ข้อมูลแล้วให้ผู้ทดสอบชิมทดสอบผลิตภัณฑ์อีกครั้งหนึ่งตามลักษณะที่อธิบายได้และเห็นพ้องกันเป็นส่วนมาก แล้วทำเครื่องหมายลงบนสเกลเพื่อทำ Floating ideals และ Profile test (ภาคผนวก ข-2) ของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค นำข้อมูลมาวิเคราะห์ ideal ratio score เพื่อเป็นข้อมูลเค้าโครงของผลิตภัณฑ์ที่จะพัฒนาในการศึกษาขั้นตอนต่อไป ตัวอย่างโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคจากสูตรพื้นฐาน (ตารางที่10) ที่ได้มาทำการวิเคราะห์คุณภาพด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์ และทางประสาทสัมผัส เก็บผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นำมาวิเคราะห์ภายใน 2 วัน

1.3 การวิเคราะห์ค่าทางกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส

1.3.1 **คุณภาพทางกายภาพ** (Physical qualities) :

- ค่าการวัดสี โดยใช้เครื่องวัดสี ในหน่วย Hunter (L a b) (ภาคผนวก ค-1)
- ค่าความหนืด(Viscosity) โดยมีหน่วยเป็นเซนติพอยส์ (Centipoise) (ภาคผนวก ค-2)
- ค่าทางด้านเนื้อสัมผัส (ภาคผนวก ค-3)

1.3.2 **คุณภาพทางเคมี** (Chemical qualities) :

- ค่าการวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของน้ำข้าวกล้องและโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค โดยใช้ พีเอชมิเตอร์ (pH-meter) (ภาคผนวก ค-4)
- ค่าการวัดปริมาณกรดทั้งหมดที่สามารถไตเตรทได้(Total titratable acidity) ของน้ำข้าวกล้องและโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค (ภาคผนวก ค-5)

1.3.3 **คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์** (Microbiological qualities) :

- ตรวจหาเชื้อทั้งหมดโดยวิธี pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาคผนวก ค-13)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- ตรวจหาเชื้อ *Bifidobacterium longum* โดยใช้วิธี Subtraction method (ภาคผนวก ค-14)

1.3.4 **ลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส (Sensory evaluation) :**

- ทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้แบบทดสอบ Ideal ratio profile technique (ภาคผนวก ข-3) โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ได้รับการฝึกฝนจำนวน 10-15 คน โดยคัดเลือกจากพฤติกรรมพื้นฐานการบริโภคโยเกิร์ต

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ Mean ideal ratio score เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไป

ตอนที่ 2 ศึกษาอัตราส่วนของข้าวกล้องสุกต่อน้ำที่เหมาะสมในการผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าอัตราส่วนของข้าวกล้องสุกต่อปริมาณที่ใช้มีผลต่อคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค โดยแบ่งกลุ่มการศึกษาอัตราส่วนของข้าวกล้องต่อปริมาณน้ำที่ใช้ เป็น 4 กลุ่ม โดยอัตราส่วนของข้าวกล้องต่อน้ำแตกต่างกันดังนี้

กลุ่มที่ 1 อัตราส่วนของข้าวกล้องต่อน้ำ เท่ากับ 1: 4 (w/w)
กลุ่มที่ 2 อัตราส่วนของข้าวกล้องต่อน้ำ เท่ากับ 1: 6 (w/w)
กลุ่มที่ 3 อัตราส่วนของข้าวกล้องต่อน้ำ เท่ากับ 1: 8 (w/w)
กลุ่มที่ 4 อัตราส่วนของข้าวกล้องต่อน้ำ เท่ากับ 1: 10 (w/w)

กำหนดปัจจัยอื่นๆ เป็นปัจจัยคงที่ ได้แก่ ปริมาณเชื้อ *S. thermophilus L. bulgaricus* และ *B. longum* น้ำตาล นมผงขาดมันเนย คาราจีแนน และควบคุมการผลิตให้เป็นแบบเดียวกันดังวิธีในข้อ 1.2.1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design (CR D) สำห รับการวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ เช่นเดียวข้อที่ 1.3.1-1.3.4 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan' s Multiple

Range Test (DMRT) เพื่อสรุปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป การวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส วิธีการเช่นเดียวกับ 1.3.4 โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

ตอนที่ 3 ศึกษาแนวทางในการพัฒนาสูตรและอิทธิพลของส่วนผสมต่อคุณภาพและการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

3.1 การกลั่นกรองปัจจัยทดลองเพื่อหาปัจจัยที่มีความสำคัญต่อคุณภาพของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

ปัจจัยทดลองที่ต้องการกลั่นกรองในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค มีทั้งหมด 5 ปัจจัย ได้แก่ นมผงขาดมันเนย น้ำตาลทรายขาว คาราจีแนน เชื้อโยเกิร์ต และเชื้อ *B. longum* โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design N = 8 (Plackett and Burman, 1946) ซึ่งทำให้ได้สิ่งทดลองดังตารางที่ 11 และกำหนดระดับสูงต่ำของปัจจัยแสดงในตาราง 12

ตารางที่ 11 แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design(N = 8)ที่ใช้ในการกลั่นกรองปัจจัยทดลองเพื่อหาปัจจัยที่มีความสำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

หน่วยทดลอง	A	B	C	D	E	F	G
3.1.1	+	+	+	-	+	-	-
3.1.2	+	+	-	+	-	-	+
3.1.3	+	-	+	-	-	+	+
3.1.4	-	+	-	-	+	+	+
3.1.5	+	-	-	+	+	+	-
3.1.6	-	-	+	+	+	-	+
3.1.7	-	+	+	+	-	+	-
3.1.8	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + แทนการใช้ปัจจัยในระดับสูง

- แทนการใช้ปัจจัยในระดับต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยที่กำหนดให้ปัจจัยต่างแทนด้วยตัวอักษรดังต่อไปนี้

A แทน ปริมาณนมผงขาดมันเนย

B แทน ปริมาณน้ำตาลทรายขาว

C แทน ปริมาณคาราจีแนน

D แทน ปริมาณหัวเชื้อโยเกิร์ต(*L. bulgaricus* และ*S. thermophilus*)

E แทน ปริมาณหัวเชื้อ*B. longum*

F แทน dummy variable

G แทน dummy variable

ตารางที่ 12 ระดับสูงและระดับต่ำของแต่ละปัจจัยเป็นร้อยละ

ปัจจัย	ระดับสูง(+)	ระดับต่ำ(-)
A	10	15
B	5	10
C	0.1	0.2
D	1	2
E	1	2

สำหรับการวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ มีวิธีการเช่นเดียวข้อที่ 1.3.1-1.3.3 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ส่วนการวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส มีวิธีการเช่นเดียวกับ 1.3.4

ทำการบันทึกข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจากการทดลอง การกลั่นกรองจำนวนปัจจัย และระดับการใช้ปัจจัยต่าง ๆ ในการทดลอง Plackett and Burman นำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม P&B เพื่อคัดเลือกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การหาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยทดลอง

นำปัจจัยที่กลั่นกรองได้ว่ามีความสำคัญต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค ซึ่งได้จากการทดลองตอนที่ 3.1 ได้แก่ นมผงขาดมันเนยและคาราจีแนน มาทำการหาระดับที่เหมาะสมโดยวางแผนการทดลองแบบ 2^n Factorial experiment in central composite design (CCD) กำหนดให้แต่ละปัจจัยทดลองมี 5 ระดับ คือ ระดับสูง (+1) ระดับต่ำ (-1) จุดกึ่งกลาง (0) และตำแหน่ง $\pm\alpha$ (Milton, 1992)

นำผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคที่แต่ละสูตรมาวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ เช่นเดียวข้อที่ 1.3.1-1.3.3 ส่วนการวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส วิธีการเช่นเดียวกับ 1.3.4

นำข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการศึกษาระดับการใช้ส่วนผสมต่าง ๆ ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค ที่ระดับ $-\alpha$ ถึง $+\alpha$ มาวิเคราะห์ผลทางด้านสถิติ โดยใช้วิธีการวิเคราะห์รีเกรสชัน (Regression analysis) (ภาคผนวก ง-1) เพื่อหาข้อสรุปจากการทดลองถึงอิทธิพลของ นมผงขาดมันเนย และคาราจีแนน ที่มีต่อคุณภาพและการยอมรับของผู้ทดสอบชิม และทำให้ทราบถึงสูตรของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคที่เหมาะสม

ตอนที่ 4 ศึกษาระยะเวลาการหมักโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคที่เหมาะสม

ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักมีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ต้องอาศัยระยะเวลาในการเจริญ สร้างกรดและกลิ่นรสที่ดีให้ได้ตามต้องการในผลิตภัณฑ์ โดยได้ศึกษาระยะเวลาที่ใช้ในการหมักดังนี้

กลุ่มที่ 1 ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก 4 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 2 ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก 8 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 3 ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก 12 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 4 ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก 16 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 5 ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก 20 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 6 ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมัก 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อครบระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักโยกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค แล้วเก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และจุลินทรีย์ภายใน 5 ชั่วโมง ส่วนคุณภาพทางด้านกายภาพและทางด้านประสาทสัมผัสทำการวิเคราะห์ภายใน 2 วัน หลังจากครบระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design (CR D) สำห รับการวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ เช่นเดียวข้อที่ 1.3.1-1.3.4 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan' s Multiple Range Test (DMRT) เพื่อสรุปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป การวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับ 1.3.4 โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

ตอนที่ 5 ศึกษาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคหลังการพัฒนา

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค โดยใช้สูตรที่เหมาะสมจากตอนที่ 2 และตอนที่ 3 รวมทั้งระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการหมักที่ได้จากตอนที่ 4 นำโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคมาทำการวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

5.1 **คุณภาพทางกายภาพ** (Physical qualities) :

- ค่าการวัดสี ในหน่วย Hunter (L a b) (ภาคผนวก ค-1)
- ค่าความหนืด(Viscosity) โดยมีหน่วยเป็นเซนติพอยส์ (Centipoise) (ภาคผนวก ค-2)
- ค่าทางด้านเนื้อสัมผัส (ภาคผนวก ค-3)

5.2 **คุณภาพทางเคมี** (Chemical qualities) :

- ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) โดยใช้ พีเอชมิเตอร์(pH-meter) (ภาคผนวก ค-4)
- ปริมาณกรดทั้งหมดที่สามารถไตเตรทได้ (Total titratable acidity) โดยวิธีไตเตรท (ภาคผนวก ค-5)
- ปริมาณน้ำตาลซูโครส โดยวิธีการของ Lane and Eynon (ภาคผนวก ค-6)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีการของ Lane and Eynon (ภาคผนวก ค-6)
- ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก ค-6)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- หาปริมาณความชื้น (water content) (ภาคผนวก ค-7)
- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี semi-micre Kjeidal distillation (ภาคผนวก ค-8)
- วิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ภาคผนวก ค-9)
- วิเคราะห์ปริมาณเส้นใย (ภาคผนวก ค-10)
- วิเคราะห์ปริมาณเถ้าทั้งหมด (ภาคผนวก ค-11)
- คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ภาคผนวก ค-12)

5.3 **คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ (Microbiological qualities) :**

- นับจำนวนเชื้อเริ่มต้นทั้งหมดโดยวิธี pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาคผนวก ค-13)
- นับจำนวนเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus และ Streptococcus thermophilus* บน อาหารเลี้ยงเชื้อ HHD agar (ภาคผนวก ค-14)
- คำนวณเชื้อ *Bifidobacterium longum* โดยใช้วิธี Subtraction method (ภาคผนวก ค-14)
- จำนวนยีสต์และรา โดยใช้ Yeast extract glucose chloramphenical agar (ภาคผนวก ค-15)
- จำนวนเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยวิธี Most probable number ใช้ Lauryl tryptose broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ค -16)

5.4 **ลักษณะทางด้านประสาทสัมผัส (Sensory evaluation) :**

- ทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้แบบทดสอบ Ideal ratio profile technique (ภาคผนวก ข-3) โดยใช้ผู้ทดสอบชิมที่ได้รับการฝึกฝนจำนวน 10-15 คน โดยคัดเลือกจากพฤติกรรมพื้นฐานการบริโภคโยเกิร์ต

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน และ Mean ideal ratio score ของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคที่ได้รับการพัฒนาแล้วเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคก่อนการพัฒนาและผลิตภัณฑ์ในอุดมคติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 6 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน

เตรียมผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสรุปสูตรส่วนผสมและกระบวนการผลิตที่เหมาะสมตามตอนที่ 2 ตอนที่ 3 และตอนที่ 4 ตามลำดับ แล้วบรรจุในขวดแก้วปิดฝาสนิท ขนาด 600 มิลลิลิตร นำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างมาตรวจ 7 ครั้ง สุ่มตัวอย่างครั้งละ 3 ขวด หลังผลิตและทำการตรวจคุณภาพผลิตภัณฑ์ทุก 5 วัน เป็นระยะเวลา 30 วัน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยนำตัวอย่างมาวิเคราะห์คุณภาพด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ดังเช่นเดียวกับข้อที่ 1.3.1, 1.3.2, 1.3.3 และ 1.3.4 ตามลำดับ นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์มาหาค่าเฉลี่ย ±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และ Mean ideal ratio score

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จ
663.64
ต387ก
ค.4
เลขหมู่.....
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่